

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. November 2005 (10.11.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/105167 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61L 27/20**,
A61K 9/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002201

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. März 2005 (02.03.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 019 241.3 16. April 2004 (16.04.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **CELLMED AG** [DE/DE]; Industriestrasse 19, 63755
Alzenau (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **REINER, Roland**
[DE/DE]; Am Oberfeldd 19, 64287 Darmstadt (DE).
GEIGLE, Peter [DE/DE]; In den Mühlgärten 42, 63755
Alzenau (DE). **GLÖCKNER, Herma** [DE/DE]; Damm-
sweg 4, 63839 Kleinwallstadt (DE). **THÜRMER, Frank**
[DE/DE]; Carl-Diem Str. 23, 63755 Alzenau (DE).

(74) Anwälte: **SCHNEIDER, Michael** usw.; Hammonds,
Karl-Scharnagl-Ring 7, 80539 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL,
PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** INJECTABLE CROSSLINKED AND UNCROSSLINKED ALGINATES AND THE USE THEREOF IN MEDICINE
AND IN COSMETIC SURGERY

(54) **Bezeichnung:** INJIZIERBARE VERNETZTE UND UNVERNETZTE ALGINATE UND IHRE VERWENDUNG IN DER
MEDIZIN UND IN DER ÄSTHETISCHEN CHIRURGIE

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of implantable microcapsules, or microparticles or gels produced from alginates that
are crosslinked with bivalent or multivalent cations or that are uncrosslinked, for the treatment of skin defects such as e.g. wrinkles,
for the treatment of gastro-oesophageal reflux, urinary incontinence and vesico-ureteral reflux.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung von implan-tierbaren Mikrokapseln, oder Mikropar-
tikeln oder Gelen aus mit zwei- oder mehrwertigen Kationen vernetzten Alginatenn oder unvernnetzten Alginaten für die Behandlung
von Hautdefiziten wie z.B. Falten, für die Behandlung von gastroösophageale Refluxkrankheit, Harninkontinenz und der vesiko-
ureteralen Refluxerkrankung.



WO 2005/105167 A1

Injizierbare vernetzte und unvernetzte Alginat und ihre Verwendung in der Medizin und in der ästhetischen Chirurgie

1. Gebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft injizierbare unvernetzte und vernetzte Alginat und deren Verwendung auf dem medizinischen, pharmazeutischen und ästhetisch chirurgischen Gebiet als Füllmaterial zur Volumen- und Defektauffüllung. Insbesondere beschreibt diese Erfindung die Anwendung von injizierbaren unvernetzten und vernetzten Alginaten bei der Korrektur von Falten und Fältchen durch Unterspritzung in die Haut, zur Volumenauffüllung, sowie die Verwendung zur Behandlung der gastroösophagealen Refluxkrankheit, Harninkontinenz und vesiko-ureteralen Refluxkrankheit durch Unterspritzung in die entsprechende Sphinktermuskulatur.

2. Hintergrund der Erfindung

Aufgrund krankheits- oder altersbedingter Umstände oder ästhetischen Ansprüchen ist im Bereich der Medizin eine große Nachfrage nach Füllmaterialien entstanden um Haut- und Muskeleigenschaften vorteilhaft durch Volumenvergrößerung zu unterstützen.

2.1 Faltenunterspritzung

Um die vorteilhafte Behandlung von Falten, z.B. Gesichts- und Handfalten zu ermöglichen, ist es bekannt, Füllmaterialien sogenannte „Filler“ in die Haut zu injizieren. Falten entste-

hen bereits im Kindesalter durch Mimik, im späteren Alter durch physikalische Schäden wie Sonne, Temperatur, Umwelt und im fortgeschrittenen Alter durch die typische Hautalterung. Um den Wunsch vieler Patienten nach einem jugendlichen Aussehen nachzukommen, wurden verschiedene Methoden der Faltenbehandlung etabliert. Zum einen die chemische Denervierung z.B. durch Botulinumtoxin A, zum Zweiten die Oberflächennivellierung und zum Dritten die Behandlung mit „Fillern“ – dabei wird die Dermis mit körpereigenen oder körperfremden Substanzen unterfüttert. Die vorliegende Erfindung beschreibt die neuartige Verwendung von Alginaten für die Anwendung als „Filler“-Substanz. In Europa steht eine große Zahl von körperfremden Füllern zur Verfügung, die überwiegend aus biologischen Substanzen wie Kollagen oder Hyaluronsäure bestehen (z.B.: aus Kollagen: Zyderm®, Zyplast®, Atelocollagen®, Resoplast®. Aus Hyaluronsäure: Hylaform®, Restylane®, Perlane®, Juvederm®, Rofilan Hylan Gel®, Hyal-System®, Viscontur®). Kollagen ist ein natürliches Protein, welche das humane Bindegewebe elastisch hält. Präparate zum Unterspritzen werden aus humanem, porcinem und bovinem Kollagen gewonnen. Wie bekannt ist, wirkt sich dabei nachteilig aus, das Menschen auf diese Eiweißprodukte allergisch reagieren können und somit vor der Anwendung notwendigerweise Allergietests durchgeführt werden müssen. Ebenfalls nachteilig an Kollagenpräparaten, ist die Tatsache, dass Kollagen von der Injektionsstelle in andere Hautbereiche abwandern und dort Rötungen und Schwellungen verursachen kann (Millikan, 1989, Long term safety and Efficacy with Fibrel in the treatment of cutaneous scars, J Dermatol Surg Oncol, 15:837-842).

Hyaluronsäure ist ein Mucopolysaccharid, das in fast jedem Teil eines lebenden Organismus und insbesondere in der Haut vorkommt. Chemisch wird Hyaluronsäure von geraden Polymerket-

ten mit einem Molekulargewicht im Bereich von mehreren Hunderttausend bis Millionen Dalton gebildet, die sich wiederholende Disaccharideinheiten aus N-Acetylglucosamin und Glucuronsäure enthalten, welche durch glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Eine große Studie hat ergeben, dass das auf Hyaluronsäure basierende Produkt Restylane® deutlich bessere Ergebnisse liefert als das Kollagenpräparat Zyderm® (Narins et al., 2003, A randomized, double-blind, multicenter comparison of the efficacy and tolerability of restylane versus zyplast for the correction of nasolabial folds. Dermatol. Surg., 29: 588-95). Nachteilig an Hyaluronsäurepräparaten wirkt sich aus, dass die Haut für einen sichtbaren Effekt in kurzen Abständen bis zu dreimal behandelt werden muss. Dabei können Schwellungen auftreten, die erst nach 1-2 Tagen abklingen.

Sowohl von Hyaluronsäure- als auch Kollagensäurepräparaten sind Komplikationen zwei bis drei Jahre post injectionem bekannt - zu einem Zeitpunkt, bei dem die eingespritzten Materialien längst abgebaut waren (Hanke et al., 1991, Abscess formation and local necrosis after treatment with Zyderm or Zyplast Collagen Implant. Journal of American Academy of Dermatology, 25 (No 2, Part 1): 319-26; Moscona et al., 1993, An unusual late reaction to Zyderm I injections: A challenge for treatment. Plastic and reconstructive surgery, 92: 331-4).

Flüssiges Silikon wurde ebenfalls lange Zeit zur Faltenunterspritzung verwendet. Hierbei haben sich nachteilig zahlreiche Nebenwirkungen eingestellt, wie z.B. die Bildung von Knötchen, periodisch wiederkehrende Zellulitis und die Bildung von Hautgeschwüren. Daher gilt die Behandlung mit Silikon nicht mehr als empfehlenswert (z.B. Edgerton et al., 1976,

Indications for and pitfalls of soft tissue augmentation with liquid silicone, Plast. Reconstr. Surg. 58: 157-65).

2.2 Gastroösophageale Refluxkrankheit

Obwohl die gastroösophageale Refluxkrankheit (Gastroesophageal reflux disease, „GERD“) ein normales physiologisches Phänomen darstellt, kann sie zu schweren pathophysiologischen Symptomen führen. Die gastroösophageale Refluxkrankheit beschreibt den Rückfluss von saurer, enzymatischer Flüssigkeit aus dem Magen in den Ösophagus. Sie verursacht Sodbrennen, Aufstoßen und Erbrechen der Magensäure in den Mundraum oder sogar in die Lunge. Die Folgen von „GERD“ sind Verätzungen der Speiseröhre und die Bildung von Geschwüren, wobei das normale Epithelgewebe durch pathologisches Gewebe ersetzt wird. Bei gesunden Patienten schließt sich nach der Nahrungsaufnahme der untere ösophageale Sphinktermuskel. Bei Patienten die an „GERD“ leiden passiert dies nicht, stattdessen relaxiert der Muskel und die Magensäure kann bei Magenkontraktion in die Speiseröhre fließen. Dies ist die Hauptursache für „GERD“, andere Ursachen sind möglich.

Statistische Daten belegen, dass ungefähr 35% der amerikanischen Bevölkerung mindestens einmal im Monat und 5 bis 10% darunter einmal am Tag an Sodbrennen leiden. Medizinisch gesicherte endoskopische Untersuchungen zeigen, dass 2% der amerikanischen Bevölkerung unter „GERD“ leiden. Das Risiko daran zu erkranken steigt ab dem 40sten Lebensjahr (Nebel et al., 1976, Symptomatic gastroesophageal reflux: incidence and precipitating factors, Am. J. Dig. Dis., 21: 953-6). Endoskopisch sichtbare Rötungen sind die ersten Anzeichen von „GERD“. Ein fortgeschrittener Krankheitsverlauf lässt sich an der Zerstörung vom Gewebe, gefolgt von Geschwulstbildung bis

hin zum Karzinom (Adenokarzinom des Ösophagus) erkennen. Eine diffuse Geschwulstbildung tritt bei 3,5% der Patienten unter dem 65ten Lebensjahr und bei 20-30% der Patienten über dem 65ten Lebensjahr auf (Reynolds, 1996, Influence of pathophysiology, severity, and cost on the medical management of gastroesophageal reflux disease. Am J. Health-Syst. Pharm 53:5-12).

Versuche die Sphinktermuskulatur durch Unterspritzen von quellbaren Substanzen, z. B. bovines Kollagen oder Teflonpaste zu unterstützen, schlugen fehl, weil das Material im Laufe der Zeit vom ursprünglichen Injektionsort abwanderte.

Zur Zeit wird „GERD“ im allgemeinen mit Protonenpumpeninhibitoren behandelt, mit deren Hilfe bei ausreichender Dosierung der Großteil der Patienten erfolgreich behandelt werden kann. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass aufgrund der hohen Rezidivhäufigkeit nach Absetzen der säuresuppressiven Therapie bei den meisten Patienten für eine dauerhafte konservative Beseitigung der Symptome eine medikamentöse Dauertherapie erforderlich ist (Bittinger und Messmann, 2003, Neue endoskopische Therapieverfahren bei gastroösophagealer Refluxkrankheit, Z. Gastroenterol, 41: 921-8). Viele Patienten sind zudem nicht bereit, über Jahrzehnte hinweg täglich Medikamente einzunehmen. Hinzu kommt noch die Problematik der nicht unbeachtlichen Kosten einer solchen medikamentösen Dauertherapie.

Neben der offenen und laparoskopischen Fundoplikation, kommen in jüngster Zeit endoskopische Therapieverfahren zum Einsatz, mit dem Ziel die Hauptursache der gastroösophagealen Refluxkrankheit therapeutisch anzugehen, nämlich den inkompetenten unteren Ösophagussphinkter. Dabei werden 3 verschiedene

Grundprinzipien verfolgt, zum Einen Nahttechniken (z.B. endoskopische Gastropplastie, Vollwandoplikation), zum Zweiten Radiofrequenz-Applikation und zum Dritten Injektions- und Implantationsverfahren (z.B. Biopolymerinjektion, Implantationstherapie). Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Material zur Biopolymerinjektion.

Dieses Verfahren wird derzeit mit einem Polymer aus Ethylen-Vinyl-Alkohol (Enteryx®, Boston Scientific, USA) durchgeführt. Es handelt sich um ein synthetisches Polymer, das biologisch nicht abbaubar ist, chemisch inert ist, keine antigenen Eigenschaften aufweist und eine dauerhaft schwammartig-elastische Konsistenz nach Präzipitation im Gewebe besitzt. Nach Lösung der Substanz in einem Lösungsmittel (Dimethylsulfoxid) wird sie in flüssigem Zustand über eine endoskopische Injektionsnadel unter radiologischer Kontrolle gezielt in die Ösophaguswand injiziert (Unterstützung der Muskulatur, Druckanhebung). Als nachteilig stellte sich im Rahmen einer klinischen Studie heraus, dass sich nur bei 60% der Patienten nach 6 Monaten mehr als 50% des injizierten Polymers noch an der Injektionsstelle in situ befand, zum Teil waren sogar mehr als 75% der ursprünglich injizierten Menge nicht mehr nachweisbar (Devière et al., 2002, Endoscopic implantation of a biopolymer in the lower esophageal sphincter for gastro-esophageal reflux: a pilot study. Gastrointes Endsc 2002, 55: 335-41). Offensichtlich kommt es also bei einem beträchtlichen Teil der Patienten im Lauf der Zeit zu einer Abwanderung des Polymers, vermutlich durch die Wand hindurch ins Lumen des Gastrointestinaltraktes hinein.

Aufgrund der technisch vergleichsweise einfachen Methodik und den bisherigen Resultaten erscheint die Biopolymertherapie attraktiv, allerdings muss die Irreversibilität der Methode

und die Abwanderung des injizierten Materials als nachteilig kritisch betrachtet werden. Die vorliegende Erfindung beschreibt durch die neuartige Verwendung von Alginaten einen Lösungsvorschlag zu den benannten Nachteilen.

2.3 Harninkontinenz und vesiko-ureterale Refluxkrankheit

Harninkontinenz, bei der ein unfreiwilliger Harnabgang auftritt, kann als eigenständige Erkrankung oder als Begleitscheinung zu anderen Erkrankungen vorkommen. Die Harninkontinenz, von der in Deutschland über 6 Millionen Menschen betroffen sind, wird häufig als Tabuthema angesehen, damit verschwiegen und ärztliche Hilfe wird kaum in Anspruch genommen. Daher ist es schwierig, genaue Zahlen über das Auftreten von Harninkontinenz zu erstellen. Schätzungen lassen vermuten, dass in Deutschland etwa 11% der über 65-Jährigen und 30% der über 80-Jährigen von der Harninkontinenz betroffen sind. Bei den jüngeren, an Inkontinenz leidenden Personen überwiegt der Frauenanteil. Der Grund hierfür ist, dass viele Frauen nach der Schwangerschaft und der Geburt eine geschwächte Beckenbodenmuskulatur haben und auf das Training des Beckenbodens nach der Entbindung oft zu wenig Wert legen. Im höheren Lebensalter tritt Harninkontinenz häufig bei Männern als Folge der benignen Prostatahyperplasie auf. Patienten mit Harninkontinenz sind neben dem sozialen Leidensdruck prädisponiert für Harntraktinfektionen, Geschwüren, Ausschlägen und Harnsepsis. Allein in den USA werden über 10 Milliarden US Dollar jährlich für den Umgang mit Harninkontinenz ausgegeben.

Die Ursachen für Harninkontinenz können vielfältig sein, eine Ursache hierfür ist die Muskelschwäche des inneren Schließmuskels (M. sphincter urethrae internus) der Blasenmuskulatur. Für die Behandlung von Harninkontinenz werden weitläufig

Harnblasenmuskulatur relaxierende Substanzen mit anticholinergischen Wirkungen verabreicht (z.B. Wein, 1995, Pharmacology of Incontinence, Urol.clin. North Am., 22: 557-77). Nachteilig wirken sich hierbei oft die signifikanten Nebenwirkungen dieser Medikamente aus.

Neben der medikamentösen Behandlung werden chirurgische Verfahren zur Therapie der Harninkontinenz eingesetzt, z. B. die Implantation künstlicher Sphinkter (Lima et al., 1996, Combined use of enterocystopasty and a new type of artificial sphincter in the treatment of urinary incontinence, J. Urology, 156: 622-4), Injektion von Kollagenen (Berman et al., 1997, Comparative cost analysis of collagen injection and fascia lata sling cystourethropepy for the treatment of type III incontinence in women, J.Urology, 157: 122-4) und Polytetrafluoroethylenen (Perez et al., 1996, Submucosal bladder neck injection of bovine dermal collagen for stress urinary incontinence in the pediatric population, Urology, 156: 633-6).

Ähnlich wie bei der Behandlung von „GERD“ hat die Verwendung von injizierbaren Kollagenen den nachteiligen Effekt, dass die Behandlung wegen der Abwanderung des Materials häufig wiederholt werden muss (Khullar et al., 1996, GAX Collagen in the treatment of urinary incontinence in elderly women: A two year follow up. British J. Obstetrics & Gynecology, 104: 96-9) und zum Auftreten von Allergien führen kann (McClelland and Delustro, 1996, Evaluation of antibody class in response to bovine collagen treatments in patients with urinary incontinence, J. Urology, 155: 2068-73).

Die vesiko-ureterale Refluxerkrankung hat als Ursache den Rückfluss des Urins durch den Urether von der Blase in Richtung Niere während des Urinlassens. Diese Erkrankung tritt

häufig bei jungen Kindern auf. Der Urinrückfluss kann durch bakterielle Kontaminationen die Nieren permanent schädigen, von der Narbenbildung bis hin zum Verlust einer oder beider Nieren. Der Weg Nierenschädigungen zu vermeiden muss daher sein, Niereninfektionen zu vermeiden. Dies kann zum Einen durch die langfristige prophylaktische Gabe von Antibiotika mit unvorhersehbaren Nebenwirkungen geschehen, oder zum Anderen durch chirurgische Korrektur des Refluxes mit allen bekannten Risiken eines chirurgischen Eingriffes.

Obwohl der vesiko-ureterale Reflux bei Kindern im Lauf der Zeit wieder von allein vergeht, führt er in einigen Fällen zu schwerwiegenden Harnwegs- und Niereninfektionen bis hin zum Nierenversagen. Daher besteht der Bedarf an einer sicheren, effektiven, minimal-invasiven und langfristigen Methode zur Behandlung dieser Refluxerkrankung. Die endoskopische Behandlungsmethode hat gegenüber klassischen chirurgischen Methoden verschiedene Vorteile: Ambulante Behandlung, keine Narbenbildung, geringes Risiko postoperativer Obstruktion und geringere Kosten. Bislang wurden verschiedene Substanzen zur submuskulären Injektion vorgeschlagen (Teflon®, Polydimethylsiloxan®, Macroplastique®, Kollagen (Rind), Zyplast®, autologe Chondrozyten, Fettgewebe und Blut). Das Präparat Deflux® (Dextranomer/Hyaluronsäure Kopolymer) wurde auch zwischenzeitlich von der FDA zugelassen (Oswald et al., 2002, Prospective comparison and 1-year follow-up of a single endoscopic subureteral polymethylsiloxane versus dextranomer/hyaluronic acid copolymer injection for treatment of vesicoureteral reflux in children, Urology 2002; 60: 894-7).

Zusammenfassend lässt sich für alle vorgeschlagenen Anwendungen feststellen, dass die bisherigen Materialien zur Polymerunterspritzung den Nachteil haben, dass entzündliche Reaktio-

nen hervorgerufen wurden, die Materialien zum Teil abwanderten und Mehrfachinjektionen notwendig waren. Durch die vorliegende Erfindung werden diese Probleme vorteilhaft gelöst.

3. Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung von implantierbaren Mikrokapseln, oder Mikropartikeln oder Gelen aus mit zwei- oder mehrwertigen Kationen vernetzten Alginaten oder unvernetzten Alginaten für die Behandlung von Hautdefiziten wie z.B. Falten, für die Behandlung von gastroösophageale Refluxkrankheit, Harninkontinenz und der vesiko-ureteralen Refluxerkrankung.

Vorzugsweise stellt diese Erfindung ein Material für die dermale Unterspritzung im Gesichts- und Handbereich und für die Volumenvergrößerung von Muskelgewebsbereichen durch submuskuläre Unterfütterung für die Behandlung der gastroösophagealen Refluxkrankheit, Harninkontinenz und der vesiko-ureteralen Refluxkrankheit dar. Das Material wird vorzugsweise durch eine Nadel mit einem Durchmesser von 18 gauge oder kleiner injiziert und wird weder enzymatisch noch durch das Immunsystem abgebaut. Die Injektion kann über Spritzen, Katheder, Nadeln oder anderen Injektions- oder Infusionsmethoden erfolgen. Die für diese Erfindung verwendeten Mikropartikel, Mikrokapseln oder Gele bestehen aus einem biokompatiblen und nicht-toxischen Biopolymer, dem in bestimmten Anwendungsformen auch Zusätze wie z.B. Vitamine, Adhäsionsproteine, Antioxidantien, entzündungshemmende Substanzen, Antibiotika, Wachstumsfaktoren, Hormone, Nährstoffe etc., aber auch vitale Zellen zugegeben werden können.

Die Anforderungen an das Füllmaterial für die genannten Anwendungen sind:

1. Das Material soll durch eine schmale Kanüle injizierbar sein, ohne dass die geometrischen Formen, z.B. Mikrokapseln zerstört werden.
2. Das Material muss für die unterschiedlichen Anwendungen so variabel herstellbar sein, dass kurz- bis langfristige Stabilitäten in vivo erreichbar sind.
3. Das Material soll am Injektionsort verbleiben und nicht abwandern.
4. Das Material sollte im Notfall oder nach Beendigung der Indikation auflösbar sein.
5. Das Material muss biokompatibel sein.

Diese Anforderungen werden vorteilhaft durch die vorliegende Erfindung gelöst.

Die in dieser Erfindung benannten Mikropartikel, Mikrokapseln und Gele werden vorteilsmäßig aus einem hydrophilen und biokompatiblen Biopolymer hergestellt. Das benannte Biopolymer besteht aus Alginaten und seinen Derivaten.

Alginat ist ein natürlich vorkommendes anionisches unverzweigtes Polysaccharid das aus marinen Braunalgen isoliert wird. Es ist aufgebaut aus homopolymeren Gruppen von β -D-Mannuronsäure und α -L-Guluronsäure, getrennt durch heteropolymere Regionen beider Säuren. Die heute schon in großen Mengen gewonnenen technischen Alginat werden in der Industrie (z.B. Papierherstellung) und als Lebensmittelzusatzstoff (E-Nummern 400-405) eingesetzt (z.B. Askar, 1982, Alginat: Herstellung, Eigenschaften und Verwendung in der Lebensmittelindustrie. Alimenta 21: 165-8). In zunehmenden Maße

werden sie jedoch auch in der Pharmazie, Medizin und Biotechnologie eingesetzt. Sie werden routinemäßig als Bestandteil von Wundauflagen verwendet (Gilchrist and Martin, 1983, Wound treatment with Sorbsan - an alginate fibre dressing. Biomaterials 4: 317-20; Agren, 1996, Four alginate dressings in the treatment of partial thickness wounds: A comparative experimental study. Br. J. Plast. Surg. 49: 129-34). Alginate wurden und werden auch in einer ganzen Reihe von „Tissue Engineering“ und „Drug Delivery“ Projekten eingesetzt (z.B. Uluoglu et al., 2000, Technology of mammalian cell encapsulation. Advanced Drug Delivery Reviews 42: 29-64). Die entscheidende Eigenschaft der Alginat für die Verwendung in der Biotechnologie und in der Medizin ist ihre Fähigkeit zur ionotropen Gelbildung. Die Alkalisalze der Alginat sind wasserlöslich, während die Salze der Alginat mit den meisten zwei- oder mehrwertigen Kationen in wässriger Lösung unlösliche Gele (sog. Hydrogele) bilden. Die große physikalische Variationsbreite der Alginat ist durch eine Reihe von Faktoren gegeben: Viskosität (bzw. Molmassenverteilung), Konzentration, Verhältnis der Monomeren und der Affinität des für die Vernetzung eingesetzten Kations. So ist z.B. bekannt, dass mit Calcium vernetzte Alginat weniger stabile Hydrogele bilden als Alginat welche mit Barium vernetzt werden. Nicht alle Alginat eignen sich für die hier beschriebene Verwendung, da sie Verunreinigungen enthalten können, die nach der Implantation in den Menschen Immunabwehrreaktion wie zum Beispiel Fibrose oder entzündliche Reaktionen hervorrufen können (Zimmermann et al., 1992 Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis, Electrophoresis 13: 269-74).

Ein vorzugsweise zu verwendendes hochreines Alginat kann durch die Verwendung homogenen Algenrohmaterials und standardisierter Verfahren (Jork et al., 2000, Biocompatible alginates from freshly collected *Laminaria pallida* for implantation, Appl. Microbiol Biotechnol 53: 224-229) nach DE OS 198 36 960 isoliert werden. Dadurch werden die Anforderungen an die Biokompatibilität erfüllt.

Zur Verwendung können gereinigte Alginat mit einer mittleren Molmasse von 20 kDa bis 10.000 kDa kommen, vorzugsweise liegt die Molmasse zwischen 100 kDa und 1200 kDa. Die Viskosität einer 0,1 %igen (w/v) hergestellten wässrigen Alginatlösung des zu verwendenden Alginates kann zwischen 3 und 100 mPa s liegen, vorzugsweise liegt sie zwischen 10 und 40 mPa s. Die Konzentration des Alginates zur Herstellung der zu verwenden Alginatlösung liegt zwischen 0,1 und 4% (w/v), vorzugsweise liegt sie zwischen 0,4 und 1% (w/v).

Zur Herstellung der vorgeschlagenen Mikrokapseln wird zunächst deren geometrische Gestalt aus Alginat geformt. Um kugelförmige Kapseln zu erzeugen, wird eine Alginatlösung (z.B. Kalium- oder Natriumalginat in physiologischer Kochsalzlösung) zweckmäßig in ein Fällbad mit gelöstem Vernetzer vertropft. Der Vernetzer besteht vorzugsweise aus zweiwertigen Kationen, z.B. gelöstes Calcium oder Barium (5-100 mM). Zusätzlich enthält das Fällbad vorzugsweise auch eine Puffer-substanz (z.B. Histidin) und Kochsalz (z.B. 290 mOsmol). Für die Herstellung von sphärischen Mikrokapseln eignen sich luftbeaufschlagte Sprühdüsen oder andere dem Stand der Technik entsprechende Verkapselungs- und Vertropfungsmethoden. Während des Herstellungsprozesses lassen sich, auf im Stande der Technik bekannte Weise, auch zusätzliche Substanzen (z.B. Vitamine, Adhäsionsproteine, entzündungshemmende Substanzen,

Antibiotika, Wachstumsfaktoren, Hormone, Nährstoffe, Marker-substanzen, vitale Zellen) in die Alginatkapseln bringen. Nach der Herstellung folgen vorzugsweise mehrere Waschschr-
itte mit einer physiologischen Kochsalzlösung oder einer ande-
ren geeigneten Waschlösung und gegebenenfalls eine Inkubation
in einer Natriumsulfatlösung vorzugsweise nach US 6592886.
Die Abtrennung der Mikrokapseln aus dem Fällungs- und Wasch-
bädern erfolgt vorzugsweise mit einer Zentrifuge oder anderen
geeigneten Methoden. Mikrokapseln aus vernetztem Alginat sind
keine starren oder festen Gebilde, sondern sind in hohem Maße
flexibel und elastisch aber dennoch formstabil.

Die Größe der Mikrokapseln hängt von der Vertropfungsmethode
und von der Viskosität (bzw. von der Molmassenverteilung des
Alginates) und der Konzentration der Alginatlösung ab. Es
können Mikrokapseln mit einem Durchmesser von 10 µm bis
2000 µm zur Anwendung kommen, vorzugsweise werden Kapseln mit
einem Durchmesser von 100 bis 400 µm verwendet. Die Herstel-
lung und Abfüllung der Alginatlösung oder der Mikrokapseln
aus Alginat erfolgt steril und/ oder die Produkte werden mit
einer geeigneten, dem Stand der Technik entsprechenden Metho-
de endsterilisiert (z.B. Gammasterilisation). Sowohl die Al-
ginatlösung als auch die Mikrokapseln aus vernetztem Alginat
sind in gefrorenem Zustand lagerfähig.

Alginat sind Biopolymere. Ihre Haltbarkeit in vivo hängt von
der Vernetzung und der Konzentration ab. In der vorliegenden
Erfindung kann die angestrebte Haltbarkeit in vivo über diese
Parameter gesteuert werden. Für langfristig stabile Anwendun-
gen werden vorzugsweise mit Barium vernetzte Mikrokapseln aus
Alginat angewendet. Für weniger langfristige Anwendungen wer-
den mit Calcium vernetzte Mikrokapseln aus Alginat angewen-
det. Die Kapseln sind vorzugsweise in einer physiologischen

injizierbaren Kochsalzlösung suspendiert oder in einer anderen dem Stand der Technik entsprechenden Injektionslösung. Durch die Anwendung in Kapselform oder anderen unlöslichen bzw. schwerlöslichen geometrischen Formen wird vorteilhaft eine Diffusion oder ein Abwandern des Materials in das umliegende Gewebe verhindert. Diese Eigenschaft liegt darin begründet, dass es sich um weiche, elastische Anwendungsformen handelt, wohingegen harte Formen im Gewebe verschoben werden. Um diesen Effekt noch zu verstärken können dem Alginat auch Substanzen beigemischt oder kovalent an das Alginat gebunden werden die eine histologische Verbindung nach der Injektion zwischen den Alginatkapseln oder dem Alginatgel und dem umgebenen Gewebe bewirken. Solche Substanzen sind als Adhäsionsproteine (z.B. RGD-Tripeptide) bekannt. Diese Substanzen können vorteilsmäßig das Abwandern der injizierten Alginatanwendungsformen zusätzlich verhindern.

Mit Barium vernetzte Mikrokapseln aus Alginat können zu jedem Zeitpunkt nach der Implantation, wenn erwünscht, z.B. durch eine Injektion in den Implantationsort mit einer EDTA Lösung ($> 1 \text{ mM}$) wieder aufgelöst werden. Mit Calcium vernetzte Mikrokapseln können ebenfalls mit einer EDTA-Lösung aufgelöst werden, vorzugsweise aber mit einer Citratlösung ($>10 \text{ mM}$).

Kurzfristige Volumenauffüllungen können durch Injektion eines unvernetzten Alginatgels, z.B. Natrium- oder Kaliumalginat gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, erreicht werden. Dabei wird die Viskosität des unvernetzten Alginatgels über die Konzentration des Alginates dem gewünschten Zweck nach eingestellt. Erfindungsgemäß kann das Alginatgel auch gleichzeitig, z.B. durch eine parallele Injektion des Vernetzers z.B. eine Calciumchlorid- oder Bariumchloridlösung injiziert

werden, wodurch eine Aushärtung des Alginatgeles in situ erzielt wird. Die Injektion des Vernetzers zur in situ-Aushärtung kann auch nach der Injektion des Alginatgeles erfolgen. Anwendbar sind auch Calcium- oder Barium- vernetzte Mikrokapseln aus Alginat die in einer nicht vernetzten Alginatlösung suspendiert sind und injiziert werden. In den Kapseln kann ein Überschuss an Vernetzer-Ionen z.B. komplexiertes Barium- oder Calcium eingebracht sein, das nach der Implantation in das nicht vernetzte Alginatgel diffundiert und dort ebenfalls zu einer in situ Aushärtung führt. Durch Zugabe von Komplexbildnern, sogenannter „Verzögerer“ (z.B. Natriumtriphosphat), zum unvernetzten Alginatgel unmittelbar vor der Injektion und gleichzeitiger Zugabe des Vernetzers, z.B. in Form von Calcium oder Bariumsulfat tritt ein verzögertes Vernetzen des Alginatgels ein, so dass eine leichte Injektion der Alginatlösung möglich ist, am Implantationsort aber im Laufe der Zeit eine Vernetzung des Alginatgeles zu einem stabilen hochviskosen Gel einsetzt. Der gleiche Effekt der in situ Vernetzung kann erzielt werden, wenn unmittelbar vor der Injektion D-glucono- δ -lactone (GDL) und der Vernetzer in Form von Calcium oder Bariumcarbonat zur unvernetzten Alginatlösung hinzugegeben wird. Durch das GDL kommt es im Laufe der Zeit zu einer leichten Ansäuerung der Alginatlösung, die bedingt, dass die Calcium und Bariumcarbonate in Hydrogencarbonate und freies Calcium oder Barium dissoziieren und diese Kationen das Alginat in situ vernetzen.

In einer Anwendungsform am Menschen umfasst die Erfindung die Anwendung des Alginatmaterials für die Behandlung von Hautfalten durch inter- oder subdermale Unterspritzung der betroffenen Hautareale. Vorzugsweise werden die Mikropartikel, Mikrokapseln oder Gele aus Alginat durch eine Spritze mit einem Nadeldurchmesser von 26 Gauge oder kleiner injiziert,

oder anderen geeigneten Techniken. Die Injektion kann entweder durch mehrfaches bzw. vielfaches Einspritzen in die betreffenden Hautareale erfolgen, wobei bei jedem Einstich nur ein sehr kleines Volumen übertragen wird, bis ein Gesamtvolumen von 0,1ml bis 2ml unterspritzt wurde. Dadurch wird eine flächige Aufpolsterung und Straffung der Haut erzielt, die zum Verschwinden oder teilweisen Verschwinden der Falten in dem entsprechenden Areal führt. Oder die Injektion erfolgt einmalig bis mehrmalig wobei ein großes Volumen appliziert wird, vorzugsweise durch langsames Zurückziehen der Injektionsnadel bei gleichzeitiger Volumenunterspritzung, diese Injektionsmethode eignet sich insbesondere bei tieferen Falten. In einer Anwendungsform werden mit Barium vernetzte Mikrokapseln aus Alginat mit einem Durchmesser von 50-400 µm, vorzugsweise mit einem Durchmesser von 200 µm injiziert. Erfindungsgemäß können auch andere oben beschriebene Anwendungsformen verwendet werden, z. B. Injektion von Calcium vernetzten Mikrokapseln aus Alginat oder Injektion von unvernetzten Alginatgelen mit und ohne Methoden zur in situ Vernetzung. Die hier beschriebene Erfindung der dermalen Unterspritzung mit vernetzten und unvernetzten Alginaten eignet sich für Hautdefizite, die durch z.B. Altern, Umwelteinflüsse, Gewichtsverlust, Schwangerschaft, chirurgische Eingriffe und Akne verursacht werden. Die erfindungsgemäße Anwendung eignet sich insbesondere zur Behandlung von Stirnfalten, Zornesfalten, Kummerfalten, Schlupflider, Krähenfüße, Nasolabialfalten sowie zur Lippenunterspritzung und zur Behandlung von Falten im Handbereich.

In einer weiteren Anwendungsform am Menschen umfasst die Erfindung die Behandlung der gastroösophagealen Refluxkrankheit durch Implantation oder Injektion der Mikrokapseln in die Wandbereiche des unteren ösophagealen Sphinkter Muskels. Das

Sphinkter Volumen erhöht sich proportional zum Volumen der injizierten Mikrokapseln. Dadurch wird das innere Lumen des Sphinktermuskels verkleinert und erlaubt somit eine bessere Kontraktion des Muskels und verhindert somit ein Austreten der Magensäure in den Ösophagus. Erfindungsgemäß können auch andere oben beschriebene Anwendungsformen verwendet werden, z. B. Injektion von Calcium vernetzten Mikrokapseln aus Alginat oder Injektion von unvernetzten Alginatgelen mit und ohne Methoden zur in situ Vernetzung. Die Implantation ist vorzugsweise mit Standardtechniken durchzuführen die dem Stand der Technik entsprechen, wie z.B. endoskopische oder laparoskopische Techniken.

In einer weiteren Anwendungsform am Menschen werden die Mikrokapseln für die Behandlung der Harninkontinenz und der vesiko-ureteralen Refluxkrankheit in den ureteralen Sphinkter, den Blasensphinkter oder die Harnröhrenmuskulatur injiziert. Das Sphinkter Volumen erhöht sich proportional zum Volumen der injizierten Mikrokapseln. Dadurch wird das innere Lumen des Sphinktermuskels verkleinert und erlaubt somit eine bessere Kontraktion des Muskels wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Harninkontinenz sinkt. Erfindungsgemäß können auch andere oben beschriebene Anwendungsformen verwendet werden, z. B. Injektion von Calcium vernetzten Mikrokapseln aus Alginat oder Injektion von unvernetzten Alginatgelen mit und ohne Methoden zur in situ Vernetzung. Die Implantation ist vorzugsweise mit Standardtechniken durchzuführen die dem Stand der Technik entsprechen, wie z.B. endoskopische oder laparoskopische Techniken.

Die Verwendung von vernetzten Alginaten z.B. in Form von Mikrokapseln eignet sich auch beim temporären, nicht chronischem Auftreten von Formen der Harninkontinenz sowie der ga-

stroösophagealen und vesiko-ureteralen Refluxkrankheit, da erfindungsgemäß die vernetzten Alginat durch Injektion einer EDTA oder Citratlösung, oder einer Lösung aus anderen Komplexbildnern wieder aufgelöst werden können.

Die erfindungsgemäßen Anwendungen zur Faltenunterspritzung, zur Behandlung der gastroösophagealen und vesiko-ureteralen Refluxkrankheit und zur Behandlung der Harninkontinenz können mit konventionellen Behandlungsmethoden kombiniert werden.

Zusammenfassung der primären Vorteile der vorliegenden Erfindung gegenüber dem Stand der Technik sind:

- Minimal-invasive Eingriffe am Patienten verglichen zu herkömmlichen chirurgischen Behandlungsmethoden
- Länger anhaltende Effekte verglichen zu herkömmlichen Therapien
- Gute Verträglichkeit und Biokompatibilität
- Vermeidung von wiederholenden Eingriffen
- Vermeidung von Materialabwanderung
- Hohe Flexibilität und Elastizität bei gleichzeitiger Formstabilität
- Hohe Variabilität der Stabilität
- Reversibilität der Anwendung

Beispiele

1. Herstellung einer 0,6% (w/v) Alginatlösung

Die 0,6% (w/v) Alginat-Lösung wird unter einer Laminar Flow hergestellt. Alle benötigten Reagenzien und Materialien müssen steril sein. Ein steriles 50 ml Röhrchen aus Polystyrol wird tariert. In das Röhrchen wird unter der Laminarflow mit einem sterilen Spatel 0,15 g getrocknetes Alginat als Festsubstanz gegeben. Unter der Laminarflow wird mit sterilen Pinzette 25ml 0,9 % NaCl-Lösung zugegeben. Das geschlossene Röhrchen wird solange rotiert (Reagenzglasrotationsgerät) bis das Alginat vollständig gelöst ist. Die so hergestellte Alginatlösung kann nun zum Herstellen von Mikrokapseln aus Alginat verwendet werden (siehe Beispiel 3) oder sie wird steril nach dem Stand der Technik in Spritzen abgefüllt und in den Verkehr gebracht.

2. Herstellung des Bariumhaltigen Fällbades zum Vernetzen der Mikrokapseln aus Alginat

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von einem Liter Fällungsbad.

Es werden 4,48 g BaCl_2 , 0,77 g Histidin, 7,25 g NaCl und 1000ml steriles destilliertes Wasser abgewogen bzw. abgemessen und in ein Becherglas überführt. Die Lösung wird gerührt bis sich alle Substanzen gelöst haben. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit NaOH oder HCl auf $\text{pH } 7 \pm 0,1$ eingestellt. Mit einem Gefrierpunktsosmometer wird die Osmolalität der hergestellten Lösung überprüft, sie muss bei $290 \text{ mOsmol} \pm 3 \text{ mOsmol}$ liegen. Anschließend wird die Lösung autoklaviert

und kann dann für die Herstellung von Barium vernetzten Mikrokapseln aus Alginat (siehe Beispiel 3) verwendet werden.

3. Herstellung von Barium vernetzen Mikrokapseln aus Alginat

Zunächst wird die Alginatlösung (siehe Beispiel 1) unter einer Laminar Flow sterilfiltriert. Dies erfolgt durch Filtration durch einen 0,2 µm Sterilfilter. Die Lösung wird langsam durch den Filter gedrückt und in einem sterilen 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Das Röhrchen wird verschlossen und gekennzeichnet. Die Alginatlösung wird bei 1000 ± 100 U / min für 5 ± 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die autoklavizierte Verkapselungsapparatur wird mit 2 Schrauben in einer Höhe von 10 ± 2 cm an einen elektrisch regelbaren Spritzenvorschub angeschraubt. Ein Druckluftschlauch wird mit einer Klemme an die Apparatur angeschlossen und anschließend wird die Druckluft auf einen Wert von $3 \pm 1,0$ l/min einreguliert. Unter die Vertropfungsdüse wird eine offene Petrischale gestellt. Mit einer 1 ml Spritze wird zur Reinigung dreimal je $1 \pm 0,1$ ml steriles Wasser durch den Düsenkanal gespült. Die Geschwindigkeit der Vorschübe wird auf $3 \pm 0,5$ units eingestellt. Eine sterile 1 ml Spritze wird mit der zentrifugierten Alginatlösung luftblasenfrei gefüllt und auf die Düse gesteckt. Um Kapseln mit einem Durchmesser von 200 µm herzustellen muss der Durchmesser des Kanals der Vertropfungsdüse ca. 100 µm betragen. Der Vorschub der Düse wird eingeschaltet und eine neue Petrischale mit 40 ml Fällbad (siehe Beispiel 2) wird unter die Düse gestellt. Am Ende der Düse bilden sich nun Tropfen aus Alginat die durch den Luftstrom abreißen und in das Fällbad fallen. Die Verkapselung wird durchgeführt, bis die Spritze leer ist. Die Kapseln härten im Fällbad für 10 Minuten aus. Nachdem die Alginatkapseln ausgehärtet sind, werden sie in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ± 1 ml 0,9% NaCl-Lösung überführt. Anschließend werden die Kapseln 5

mal mit $10 \pm 0,1$ ml 0,9% NaCl gewaschen. Danach werden die Kapseln in 10 ml der 6mM Na₂SO₄-Lösung überführt und für 20 ± 2 min in einen Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) gestellt. Danach wird die Na₂SO₄-Lösung abgezogen und es werden $10 \pm 0,1$ ml 0,9% NaCl-Lösung zugegeben und für 20 ± 2 min in einem Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Danach werden die Kapseln 5x mit 10 ± 1 ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend werden die Kapseln in ein Polystyrolröhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung überführt und mit hoher Packungsdichte steril in Einmalinjektionsspritzen in Einheiten zu je 1ml abgefüllt und in den Verkehr gebracht.

Patentansprüche

1. Verwendung von Alginat als Füllmaterial in der Medizin und Chirurgie zum Zweck der Volumenauffüllung gekennzeichnet dadurch, dass das Alginat in vernetztem und/oder unvernetztem Zustand verwendet wird.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung von Hautfalten.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Unterstützung von Sphinktermuskulaturen.
4. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung der gastroösophageale Refluxkrankheit.
5. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung von Harninkontinenz.
6. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung der vesikoureteralen Refluxkrankheit.
7. Verwendung nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, dass ein hochreines und mittel- bis hochmolekulares Kalium oder Natriumalginat verwendet wird.
8. Verwendung gemäß Anspruch 1 wobei Mikrokapseln oder Mikropartikel aus Alginat verwendet werden, die mit Barium allein oder zusammen mit Calcium oder anderen zwei oder mehrwertigen Kationen vernetzt sind.
9. Verwendung gemäß Anspruch 1 wobei Mikrokapseln oder Mikropartikel aus Alginat verwendet werden, die mit Calcium vernetzt sind.
10. Verwendung gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, dass zusätzliche Wirkstoffe in das Alginat eingebracht werden, die folgenden Substanzklassen zuzuordnen sind: Vitamine, Adhäsionsproteine, entzündungshemmende Substan-

zen, Antibiotika, Wachstumsfaktoren, Hormone, Nährstoffe, Markersubstanzen, vitale Zellen.

11. Verwendung gemäß Anspruch 8 und 9 gekennzeichnet dadurch, dass die Mikrokapseln aus Alginat in einer physiologischen Injektionslösung suspendiert sind.
12. Verwendung gemäß Anspruch 8 und 9 gekennzeichnet dadurch, dass Mikrokapseln aus vernetztem Alginat mit einem Durchmesser von 20- 2000 µm verwendet werden.
13. Verwendung gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, dass andere Formen außer Kapseln aus Alginat geformt und injiziert werden, wobei die Formen mit Barium, allein oder zusammen mit Calcium oder anderen zwei oder mehrwertigen Kationen vernetzt sind.
14. Verwendung gemäß Anspruch 8 gekennzeichnet dadurch, dass die mit Barium vernetzten Mikrokapseln aus Alginat mit einer Lösung aus Ca^{2+} oder anderen zwei oder mehrwertigen Kationen gewaschen werden.
15. Verwendung gemäß Anspruch 9 gekennzeichnet dadurch, dass die mit Calcium vernetzten Mikrokapseln aus Alginat mit einer Lösung aus Ba^{2+} oder anderen zwei- oder mehrwertigen Kationen gewaschen werden.
16. Verwendung gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, dass die injizierten vernetzten Alginatformen durch eine nachträgliche Injektion einer EDTA oder Citratlösung wieder aufgelöst werden.
17. Verwendung gemäß Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, dass lösliches Alginat in einer Konzentration von 0,1 -4 % (w/v) verwendet wird.
18. Verwendung gemäß Anspruch 17 gekennzeichnet dadurch, dass das Lösungsmittel für das Alginat eine physiologische Injektionslösung ist.

19. Verwendung gemäß Anspruch 17 gekennzeichnet dadurch, dass das lösliche Alginat in den Implantationsort injiziert wird, und in situ durch parallele oder unmittelbar nachfolgende Injektion von gelöstem Barium- oder Calciumsalz allein oder zusammen mit anderen zwei- oder mehrwertigen Kationen vernetzt wird.
20. Verwendung gemäß Anspruch 17 gekennzeichnet dadurch, dass in dem löslichem Alginat komplexierte Ba^{2+} oder andere komplexierte zwei oder mehrwertige Kationen zusätzlich gelöst sind und dieses Gemisch injiziert wird, wodurch die Vernetzung in situ erfolgen.
21. Verwendung gemäß Anspruch 17 gekennzeichnet dadurch, dass Bariumcarbonat oder Calciumcarbonat und D-glucono- δ -lactone zusätzlich unmittelbar vor der Injektion in der Alginatlösung gelöst werden.
22. Verwendung nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, dass die vernetzten Alginat durch Injektion einer EDTA oder Citratlösung, oder einer Lösung aus anderen Komplexbildnern auch in situ wieder aufgelöst werden können.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002201

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61L27/20 A61K9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61L A61K C08L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARLER J J ET AL: "SOFT-TISSUE AUGMENTATION WITH INJECTABLE ALGINATE AND SYNGENEIC FIBROBLASTS" PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, WILLIAMS AND WILKINS CO., BALTIMORE, MD, US, vol. 105, no. 6, May 2000 (2000-05), pages 2049-2058, XP008029278 ISSN: 0032-1052 page 2049 - page 2051 page 2054, right-hand column - page 2056, left-hand column ----- -/--	1-15, 17-19,22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 June 2005

Date of mailing of the international search report

24/06/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hars, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2005/002201

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BENT ALFRED E ET AL: "Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocytes as a bulking agent" NEUROUROLOGY AND URODYNAMICS, vol. 20, no. 2, 2001, pages 157-165, XP009049191 ISSN: 0733-2467 abstract page 160 page 162, last paragraph page 164, last paragraph	1-15, 17-19,22
X	WO 96/39464 A (C.R. BARD, INC; LEHIGH UNIVERSITY) 12 December 1996 (1996-12-12) page 3 - page 9 page 49 - page 50	1-15,17, 18,22
X	US 5 633 001 A (ANGSTROM GERUP ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27) column 1, line 5 - line 27 column 2, line 45 - line 60 examples 2,7	1-6,10, 17-19,22
X	US 2002/151466 A1 (HUBBARD WILLIAM G ET AL) 17 October 2002 (2002-10-17) paragraph '0031! - paragraph '0033! claim 17	1-6,10, 17,18,22
P,X	XU Y ET AL: "Preparation of the soft tissue bulking agent composed of calcium alginate microspheres and its resorption in vivo" CHINESE JOURNAL OF BIOMEDICAL ENGINEERING 20 OCT 2004 CHINA, vol. 23, no. 5, 20 October 2004 (2004-10-20), pages 448-454, XP009049192 ISSN: 0258-8021 Englische Zusammenfassung	1-15, 17-19,22
X	DE 198 36 960 A1 (ZIMMERMANN, ULRICH) 17 February 2000 (2000-02-17) cited in the application page 5, line 15 - line 24 page 6, line 5 - line 24	1,7-15, 17,18,22
X	DE 42 04 012 A1 (ZIMMERMANN, ULRICH, PROF. DR., 8702 WALDBRUNN, DE) 19 August 1993 (1993-08-19) the whole document	1,7-15, 17,18,22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/002201

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-22 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/002201

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9639464	A	12-12-1996	EP 0830416 A1	25-03-1998
			JP 11507679 T	06-07-1999
			WO 9639464 A1	12-12-1996
			US 6544503 B1	08-04-2003
			US 6214331 B1	10-04-2001
US 5633001	A	27-05-1997	CA 2158638 A1	29-09-1994
			DE 784487 T1	04-11-1999
			EP 0784487 A1	23-07-1997
			JP 2995090 B2	27-12-1999
			JP 8507713 T	20-08-1996
			WO 9421299 A1	29-09-1994
US 2002151466	A1	17-10-2002	US 6432437 B1	13-08-2002
			US 5922025 A	13-07-1999
			US 6537574 B1	25-03-2003
			US 2004185021 A1	23-09-2004
			US 6558612 B1	06-05-2003
			AT 236586 T	15-04-2003
			AT 236587 T	15-04-2003
			AT 236672 T	15-04-2003
			AT 200986 T	15-05-2001
			AU 3612593 A	03-09-1993
			CA 2129993 A1	19-08-1993
			DE 69330204 D1	13-06-2001
			DE 69330204 T2	08-11-2001
			DE 69332870 D1	15-05-2003
			DE 69332870 T2	05-02-2004
			DE 69332871 D1	15-05-2003
			DE 69332871 T2	22-01-2004
			DE 69332873 D1	15-05-2003
			DE 69332873 T2	22-01-2004
			DK 631499 T3	16-07-2001
			EP 1080698 A1	07-03-2001
			EP 1080699 A1	07-03-2001
			EP 1080737 A1	07-03-2001
			EP 0631499 A1	04-01-1995
			ES 2197045 T3	01-01-2004
			ES 2197046 T3	01-01-2004
			ES 2197047 T3	01-01-2004
			ES 2157922 T3	01-09-2001
			GR 3036310 T3	31-10-2001
			HK 1002386 A1	19-07-2002
			JP 3569525 B2	22-09-2004
			JP 6506862 T	04-08-1994
			NO 942966 A	10-08-1994
			NZ 249381 A	21-12-1995
			NZ 280026 A	26-11-2004
			PT 631499 T	31-10-2001
			SG 47024 A1	20-03-1998
			WO 9315721 A1	19-08-1993
			ZA 9300506 A	11-05-1994
			AU 6905100 A	13-03-2001
			BR 0013141 A	17-09-2002
			CA 2380932 A1	22-02-2001
			CN 1370084 A	18-09-2002
			EP 1204434 A1	15-05-2002
			JP 2003507351 T	25-02-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/002201

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002151466 A1		MX PA02001613 A	21-07-2003
		TW 434006 B	16-05-2001
		WO 0112247 A1	22-02-2001
DE 19836960 A1	17-02-2000	CA 2339978 A1	24-02-2000
		WO 0009566 A1	24-02-2000
		EP 1109837 A1	27-06-2001
		NZ 509719 A	28-11-2003
DE 4204012 A1	19-08-1993	AT 150469 T	15-04-1997
		WO 9316111 A1	19-08-1993
		DE 59305882 D1	24-04-1997
		DK 626974 T3	23-06-1997
		EP 0626974 A1	07-12-1994
		ES 2101299 T3	01-07-1997
		GR 3023797 T3	30-09-1997
		JP 3217366 B2	09-10-2001
		JP 7503985 T	27-04-1995
		US 6090793 A	18-07-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002201

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61L27/20 A61K9/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61L A61K C08L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MARLER J J ET AL: "SOFT-TISSUE AUGMENTATION WITH INJECTABLE ALGINATE AND SYNGENEIC FIBROBLASTS" PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, WILLIAMS AND WILKINS CO., BALTIMORE, MD, US, Bd. 105, Nr. 6, Mai 2000 (2000-05), Seiten 2049-2058, XP008029278 ISSN: 0032-1052 Seite 2049 - Seite 2051 Seite 2054, rechte Spalte - Seite 2056, linke Spalte ----- -/--	1-15, 17-19,22

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Juni 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/06/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hars, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BENT ALFRED E ET AL: "Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocytes as a bulking agent" NEUROUROLOGY AND URODYNAMICS, Bd. 20, Nr. 2, 2001, Seiten 157-165, XP009049191 ISSN: 0733-2467 Zusammenfassung Seite 160 Seite 162, letzter Absatz Seite 164, letzter Absatz -----	1-15, 17-19,22
X	WO 96/39464 A (C.R. BARD, INC; LEHIGH UNIVERSITY) 12. Dezember 1996 (1996-12-12) Seite 3 - Seite 9 Seite 49 - Seite 50 -----	1-15,17, 18,22
X	US 5 633 001 A (ANGSTROM GERUP ET AL) 27. Mai 1997 (1997-05-27) Spalte 1, Zeile 5 - Zeile 27 Spalte 2, Zeile 45 - Zeile 60 Beispiele 2,7 -----	1-6,10, 17-19,22
X	US 2002/151466 A1 (HUBBARD WILLIAM G ET AL) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) Absatz '0031! - Absatz '0033! Anspruch 17 -----	1-6,10, 17,18,22
P,X	XU Y ET AL: "Preparation of the soft tissue bulking agent composed of calcium alginate microspheres and its resorption in vivo" CHINESE JOURNAL OF BIOMEDICAL ENGINEERING 20 OCT 2004 CHINA, Bd. 23, Nr. 5, 20. Oktober 2004 (2004-10-20), Seiten 448-454, XP009049192 ISSN: 0258-8021 Englische Zusammenfassung -----	1-15, 17-19,22
X	DE 198 36 960 A1 (ZIMMERMANN, ULRICH) 17. Februar 2000 (2000-02-17) in der Anmeldung erwähnt Seite 5, Zeile 15 - Zeile 24 Seite 6, Zeile 5 - Zeile 24 -----	1,7-15, 17,18,22
X	DE 42 04 012 A1 (ZIMMERMANN, ULRICH, PROF. DR., 8702 WALDBRUNN, DE) 19. August 1993 (1993-08-19) das ganze Dokument -----	1,7-15, 17,18,22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2005/002201

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 1-22 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002201

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9639464 A	12-12-1996	EP 0830416 A1	25-03-1998
		JP 11507679 T	06-07-1999
		WO 9639464 A1	12-12-1996
		US 6544503 B1	08-04-2003
		US 6214331 B1	10-04-2001
US 5633001 A	27-05-1997	CA 2158638 A1	29-09-1994
		DE 784487 T1	04-11-1999
		EP 0784487 A1	23-07-1997
		JP 2995090 B2	27-12-1999
		JP 8507713 T	20-08-1996
		WO 9421299 A1	29-09-1994
US 2002151466 A1	17-10-2002	US 6432437 B1	13-08-2002
		US 5922025 A	13-07-1999
		US 6537574 B1	25-03-2003
		US 2004185021 A1	23-09-2004
		US 6558612 B1	06-05-2003
		AT 236586 T	15-04-2003
		AT 236587 T	15-04-2003
		AT 236672 T	15-04-2003
		AT 200986 T	15-05-2001
		AU 3612593 A	03-09-1993
		CA 2129993 A1	19-08-1993
		DE 69330204 D1	13-06-2001
		DE 69330204 T2	08-11-2001
		DE 69332870 D1	15-05-2003
		DE 69332870 T2	05-02-2004
		DE 69332871 D1	15-05-2003
		DE 69332871 T2	22-01-2004
		DE 69332873 D1	15-05-2003
		DE 69332873 T2	22-01-2004
		DK 631499 T3	16-07-2001
		EP 1080698 A1	07-03-2001
		EP 1080699 A1	07-03-2001
		EP 1080737 A1	07-03-2001
		EP 0631499 A1	04-01-1995
		ES 2197045 T3	01-01-2004
		ES 2197046 T3	01-01-2004
		ES 2197047 T3	01-01-2004
		ES 2157922 T3	01-09-2001
		GR 3036310 T3	31-10-2001
		HK 1002386 A1	19-07-2002
		JP 3569525 B2	22-09-2004
		JP 6506862 T	04-08-1994
		NO 942966 A	10-08-1994
		NZ 249381 A	21-12-1995
		NZ 280026 A	26-11-2004
		PT 631499 T	31-10-2001
		SG 47024 A1	20-03-1998
		WO 9315721 A1	19-08-1993
		ZA 9300506 A	11-05-1994
		AU 6905100 A	13-03-2001
		BR 0013141 A	17-09-2002
		CA 2380932 A1	22-02-2001
		CN 1370084 A	18-09-2002
		EP 1204434 A1	15-05-2002
		JP 2003507351 T	25-02-2003

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002201

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2002151466 A1		MX PA02001613 A	21-07-2003
		TW 434006 B	16-05-2001
		WO 0112247 A1	22-02-2001
DE 19836960 A1	17-02-2000	CA 2339978 A1	24-02-2000
		WO 0009566 A1	24-02-2000
		EP 1109837 A1	27-06-2001
		NZ 509719 A	28-11-2003
DE 4204012 A1	19-08-1993	AT 150469 T	15-04-1997
		WO 9316111 A1	19-08-1993
		DE 59305882 D1	24-04-1997
		DK 626974 T3	23-06-1997
		EP 0626974 A1	07-12-1994
		ES 2101299 T3	01-07-1997
		GR 3023797 T3	30-09-1997
		JP 3217366 B2	09-10-2001
		JP 7503985 T	27-04-1995
		US 6090793 A	18-07-2000